

**DER NACHWEIS UND DIE IDENTIFIZIERUNG VON
LIPOPROTEINEN IM FRUCHTWASSER**

Franz Kufner

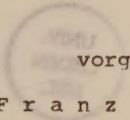
1975

AUS DER I. FRAUENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. J. Zander

DER NACHWEIS UND DIE IDENTIFIZIERUNG
VON LIPOPROTEINEN IM FRUCHTWASSER.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

 vorgelegt von
F r a n z K u f n e r
aus Bad Reichenhall

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. H. Lochmüller
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. J. Zander
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	25.11.1975



INHALTSANGABE

I.	Einleitung	1
II.	Methodik	3
	A Patienten	
	B Amniocentese	
	C Aufarbeitung des Fruchtwassers	
III.	Ergebnisse	13
IV.	Diskussion	28
V.	Zusammenfassung und Schlußbemerkung	37
VI.	Literaturverzeichnis	38
VII.	Lebenslauf	41

EINLEITUNG

In den letzten Jahren haben die Lipide im Fruchtwasser ein immer größeres Interesse gefunden. Besonders durch die Arbeiten von Nelson (1,2), Clements (4,5), Bhagwanani (6 - 8) und Gluck (9 - 12) fanden die Lipide im Fruchtwasser auch klinische Bedeutung. Diese Autoren stellten eine Korrelation zwischen den Phospholipiden, speziell dem oberflächenaktiven Lecithin im Fruchtwasser, und der foetalen Lungenreife her. Da die Lipide bekanntermaßen hydrophob sind, war es interessant, nach Trägersubstanzen für die Lipide im Fruchtwasser zu suchen. Im Blut werden die Lipide durch Lipoproteine transportiert. Lipoproteine im Fruchtwasser sind bisher gar nicht, oder nur gelegentlich, nachgewiesen worden (13 - 18). Bisher konnten niemals Lipoproteine im Fruchtwasser mittels der Lipoproteinelektrophorese dargestellt werden (14 - 20).

Seidel (21) entwickelte 1973 eine neue und sehr genaue Lipoproteinelektrophorese, bei der, im Gegensatz zu den früher beschriebenen Methoden (22), (23), nicht die Lipide angefärbt werden, sondern der Lipoproteinkomplex ausgefällt wird. Mit Hilfe dieser Lipoproteinelektrophorese und mit Hilfe von immunologischen Verfahren war es interessant, erneut nach Lipoproteinen im Fruchtwasser zu suchen. Dies ist das Thema der vorliegenden Arbeit.

METHODIK

In dieser Studie wurde Fruchtwasser von 24 verschiedenen Patientinnen in der rechnerisch 18. - 40. Schwangerschaftswoche untersucht.

Bei 8 gesunden Schwangeren (34. - 40. SSW) wurde die Amniocentese zur Bestimmung des Lezithin - Sphingomyelin (L/S ratio) aus dem Fruchtwasser zur Lungenreifebestimmung durchgeführt.

An 15 Patientinnen wurde die Amniocentese zur Bestimmung des $\angle$ E im Fruchtwasser bei RH - Inkompatibilität durchgeführt (23. - 37. SSW).

Eine Patientin wurde in der rechnerisch 18. Schwangerschaftswoche zur Einleitung der Interruptio amniocentiert (mütterliche Indikation; Kind klinisch unauffällig).

AMNIOCENTESE

Die Patientinnen wurden von verschiedenen Ärzten der I. Universitäts-Frauenklinik München nach jeweils der gleichen Methode amniocentiert. Zunächst wurde mit Hilfe des Ultraschalls und der Placentascintigraphie eine Lokalisation der Placenta durchgeführt. Bei transabdomineller Punktion wurden mit Hilfe einer Rekordspritze durchschnittlich 15 ml Fruchtwasser entnommen. Alle Amniocentesen verliefen komplikationslos und es wurde jeweils blutfreies Fruchtwasser gewonnen. Eine Beschreibung dieser Methode findet sich in: O. Käser, V. Friedberg, K.G. Ober, K. Thomsen, J. Zander. Gynäkologie und Geburtshilfe Band II, 1044 (1967)

AUFARBEITUNG DES FRUCHTWASSERS

Sämtliche Fruchtwasserproben wurden sofort nach Entnahme bei 800 x g 5 Minuten zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abpipettiert, so daß in der zur Untersuchung gelangten Probe keine Vernix caseosa vorhanden war.

Anschließend wurde der Überstand entweder bei - 20 Grad Celsius in einem verschlossenen Behälter aufbewahrt oder sofort aufgearbeitet.

Der Lezithin - Sphingomyelin Quotient (L/S ratio) wurde nach der Methode von Gluck in der Modifikation von Borer bestimmt (10,11):

" 1 ml Fruchtwasser in 1 ml Methanol und 2 ml Chloroform extrahieren. Chloroform Unterphase abziehen, unter N₂ eindampfen.

Rückstand mit eiskaltem, wasserfreiem Aceton behandeln (30 Minuten im Eisbad), zentrifugieren bei 800 x g/min, Aceton abdekantieren. Rückstand mit 6 µl Chloroform aufnehmen und punktförmig auf eine Dünnschichtplatte (Merck, Silica Gel) auftragen.

In Chloroform/Methanol/Wasser = 65/25/4 (V/V) entwickeln. Nach dem Lauf (45 Minuten) an der Luft trocknen und mit 4 % Bromthymol Blau Lösung besprühen. In Amoniak (NH_4) Dämpfe entwickeln. Die dunkelblau sichtbar gewordenen Flecken Länge x Breite ausmessen. Zur Identifikation des Lezithin bzw. des Sphingomyelin Referenzsubstanz mitlaufen lassen" (siehe Abbildung XI).

$$\text{L/S ratio} = \frac{\text{Lezithin Fleck (Länge x Breite)}}{\text{Sphingomyelin Fleck (Länge x Breite)}}$$

Die Gesamthospholipide wurden mit Boehringer-reagenzien nach der Methode von Bottcher (24) bestimmt.

Cholesterin: Das Gesamtcholesterin wurde mit
Boehringerreagenzien nach der
Methode von D. Watson (24) bestimmt.

Das Gesamtprotein wurde nach Heil und Zillig (25) bestimmt.

Die Lipoproteine wurden mit Hilfe der präparativen Ultrazentrifuge (Modell Beckmann Sphingo 65 LII) in einem Rotor Type 50 Ti bei einer Dichte $d = 1,21$ bei $105000 \times g$ über 24 Stunden isoliert (26).

Isolation der Fruchtwasser Lipoproteine mittels der präparativen Ultracentrifuge

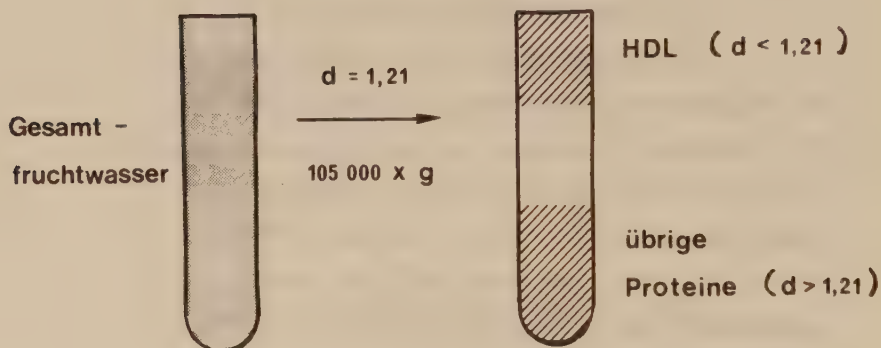


Abbildung I

Bei der Dichte $d = 1,21$ flotieren die Lipoproteine, während die übrigen Serum - (Plasma) - proteine sedimentieren (siehe Abb.I). Die einzelnen Fraktionen wurden getrennt aufgenommen und gegen 0,9 % Na Cl - Lösung mit Zusatz von Natriumazid über 15 Stunden dialysiert. Anschließend wurden die Proben sofort weiterverarbeitet.

Die Elektrophoresen wurden in Agarose/Agar unter Zusatz von Albumin und unter Verwendung eines Veronalpuffers (pH 8,6; Ionenstärke 0,05) durchgeführt. Zur Anwendung gelangten die Methode von Greten et al (23), die Methoden der Lipoproteinelektrophorese (Präcipitationselektrophorese) nach Seidel et al (21) und die Proteinelektrophorese entsprechend Greten. Statt des Färbemittels Ölröt O wurde Coomassie Brilliant Blue (R-250 Serva Heidelberg) verwendet. Die Immunelektrophorese wurde nach der Methode von Grabar (27) in 1 % Agar, Veronalpuffer (pH 8,6; Ionenstärke 0,05) durchgeführt. Die Doppelimmundiffusion wurde in 1 %-igem Agar nach Ouchterlony (28) unter Verwendung eines Veronalpuffers (pH 8,6; Ionenstärke 0,05) angefertigt. Die Immunelektrophorese und die Diffusionen wurden 24 - 36 Stunden in einer feuchten Kammer zur vollen Entwicklung der Präcipitationslinien inkubiert (bei 37 Grad Celsius).

Als Antikörper wurden Kaninchenantiseren verwendet.

- a) Kaninchenantiserum gegen α_1 - Lipoproteine (Apo-A) (Behring, Marburg)
- b) Kaninchenantiserum gegen β - Lipoproteine (Apo-B) und gegen Apo-C (Antikörper gegen CI, CII und CIII Bruchstücke).

Diese Antiseren wurden im Labor Prof.Dr. D. Seidel Med.Universitätsklinik Heidelberg hergestellt (29, 30).

- c) Kaninchenantiserum gegen Albumin (Behring, Marburg).

Die zur Verwendung gelangten Antiseren waren hochspezifisch.

Das Δ E wurde im wissenschaftlichen Labor der I. Universitäts-Frauenklinik München (Leiter Priv.Doiz.Dr.Dr.Kuss) nach der Methode von Liley (31) bestimmt.

Tabelle I

Nr.	Name	Alter	SSW	BG	E	Coombs- Test	L/S	Doppelimmun- diffusion	Präcipitations- Lipoprotein- Elektrophorese
1.	B.H.	36	35	Brh -	0,07	+	2,6	Apo A	α_2 -Lipoproteine
			30		0,14	+	0,98	"	"
2.	G.Chr.	35	36	ARH +		-	1,9	"	"
3.	K.S.	26	31	Arh -	0,19	+	0,6	"	"
4.	R.Fr.	38	23	Brh -	0,23	+	0,9	"	"
5.	R.J.	26	36	Arh -	0,06	+	1,5	"	"
6.	Sch.A.	32	35	Brh -	0,06	+	1,6	"	"
7.	T.S.	33	33	Orh -	0,17	+	2,6	"	"
8.	T.P.	34	32	Orh -	0,065	+	2,4	"	"
			37		0,05	+	2,9	"	"
9.	W.T.	39	34	Orh -	0,035	+	1,8	"	"
10.	W.H.	35	35	Arh -	0,09	+	1,5	"	"
			36		0,08	+	2	"	"

Tabelle II

Nr.	Name	Alter	SSW	BG	E	Coombs- Test	L/S	Doppelimmun- diffusion	Präzipitation Lipoprotein- Elektrophores
11.	W.A.	29	35	Arh -	0,06	+	1,25	Apo A	α_1 -Lipoprotein
12.	K.F.	41	34	Arh -	0,13	+	1,6	"	"
13.	F.E.	36	40	BRH +		-	6	"	"
14.	K.	27		Arh -		+		"	"
15.	T.Z.	24	37	ORH +		-	3,4	"	"
16.	J.A.	43	18	ARH +		-	0,9	Apo A / Apo B	α_1 -Lipoprotein
17.	C.	34	35	ARH +		-	1,4	Apo A	α_1 -Lipoprotein
18.	M.A.	33	39	ORH +		-	1,9	"	"
19.	K.G.	33	37	Orh -	0,02	+	3,5	"	"
20.	P.B.	32	35	ABRH +		-	0,7	"	"
21.	A.E.	39	35	BRH +		-	2,6	"	"
22.	St.	25	34	BRH +		-		"	"
23.	R.M.	32	32	Arh -	0,25	+	0,9	"	"
24.	W.M.	42	33	Orh -	0,08	+	1,4	"	"

ERGEBNISSE

In Vorversuchen wurde geklärt, daß es belanglos war, ob das Fruchtwasser sofort aufgearbeitet oder zunächst bei -20 Grad Celsius eingefroren und später aufgearbeitet wurde. Das Fruchtwasser wurde nur einmal aufgetaut.

Die Tabelle I zeigt summarisch die Zusammenfassung der Ergebnisse von allen Patientinnen.

Hieraus ist ersichtlich, daß bei den Patientinnen Nr. 1 - 15 und 17 - 24 immunologisch und elektrophoretisch im Fruchtwasser Lipoproteine und zwar nur α_1 - Lipoproteine (High Density Lipoproteins - HDL -) nachgewiesen wurden.

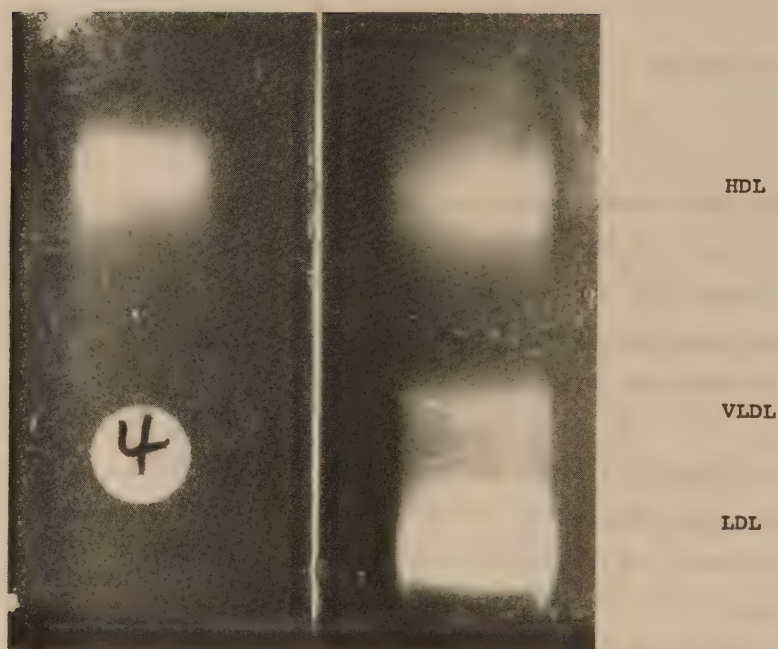


Abb.II
Lipoproteinelektrophorese nach Seidel des Serums (rechts)
und des Fruchtwassers (links) einer Patientin

Abbildung II zeigt die Lipoproteinelektrophorese nach Seidel des Serums einer Patientin und zum Vergleich die Lipoproteinelektrophorese des Fruchtwassers derselben Patientin. Im Serum sind deutlich α_1 - Lipoproteine (High Density Lipoproteins - HDL -), $\text{pre-}\beta$ - Lipoproteine (Very Low Density Lipoproteins -VLDL-) und β - Lipoproteine (Low Density Lipoproteins - LDL -) zu sehen. Im Fruchtwasser dagegen zeigen sich nur α_1 - Lipoproteine (HDL) mit normaler elektrophoretischer Mobilität.



Abb. III
 Präcipitationslipoproteinelektrophorese
 links Fruchtwasser, rechts Nabelschnurserum

In Abbildung III sieht man im Fruchtwasser α_1 - Lipoproteine, im Nabelschnurserum, wie zu erwarten, α_1 und β - Lipoproteine, jedoch keine prä- β - Lipoproteine.

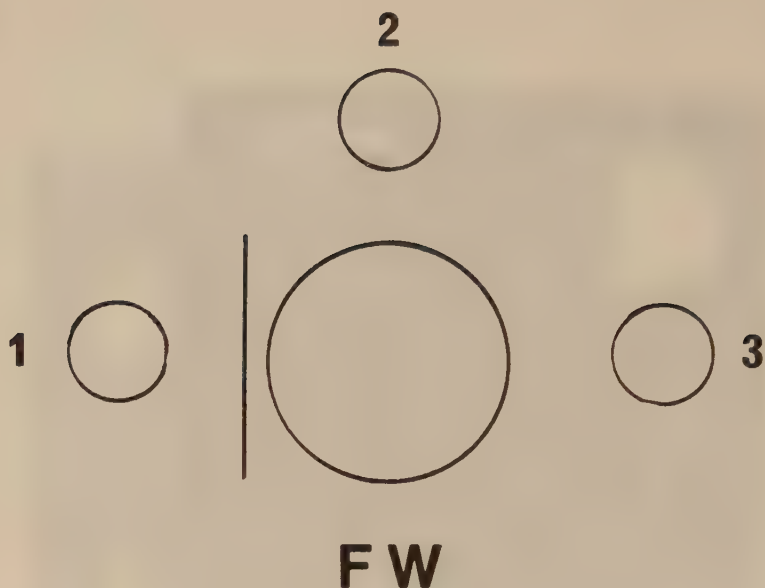


Abb. IV a

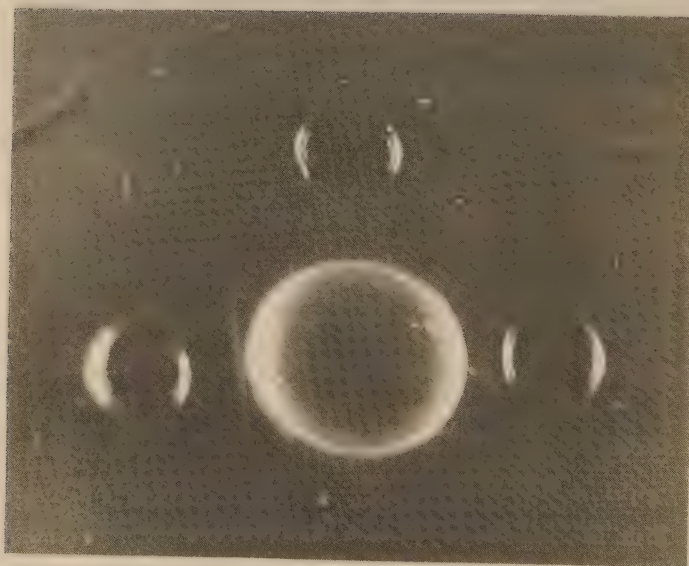


Abb.IV

Doppelimmundiffusion von Fruchtwasser derselben Patientin wie in Abbildung I gegen (1) Anti - , Antilipoproteinserum gegen (2) Anti - - Lipoproteinantiserum Apo B und gegen (3) Anti-Apo-C Antiserum.

Abbildungen IV a und IV zeigen die Radialimmundiffusion des Fruchtwassers. Es ist deutlich ersichtlich, daß nur zwischen dem Fruchtwasser und dem Anti α_1 - Lipoproteinantisera eine Präcipitationslinie ausbildete, d.h. es befinden sich im Fruchtwasser nur α_1 - Lipoproteine (HDL). Apo B und Apo C konnten nicht nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis findet sich für alle Patientinnen jenseits der 20. Schwangerschaftswoche. Die Ergebnisse von Patientin Nr. 16 werden noch gesondert behandelt.

Bei einigen Patientinnen wurde das Fruchtwasser einer herkömmlichen Lipoproteinelektrophorese unterzogen (23), wobei niemals Lipoproteine nachgewiesen wurden.

Um Lipoproteine mit Hilfe der Ultrazentrifuge zu isolieren wird eine größere Menge an Fruchtwasser benötigt. Da bei der Amniocentese, wie schon beschrieben, im Durchschnitt nur 15 ml Fruchtwasser gewonnen wurden, wurde das Fruchtwasser der Patientinnen Nr. 1, 2, 7, 12 und 24 gepoolt. Bei den Fruchtwasserproben waren nur HDL nachgewiesen worden. Mit Hilfe der Ultrazentrifuge wurden die Lipoproteine isoliert. Ihre Reinheit wurde durch die Radial-immundiffusion kontrolliert.

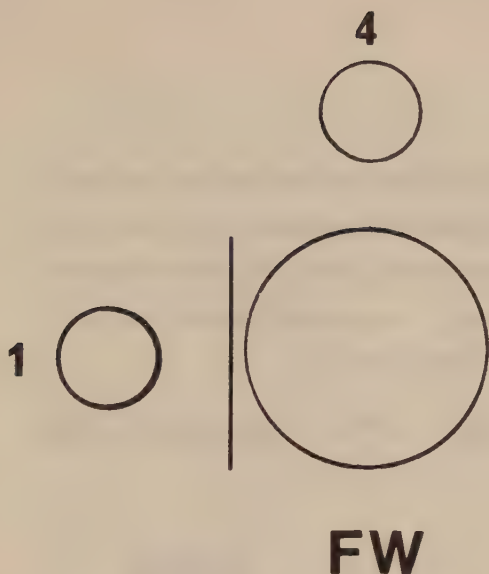


Abb. V a

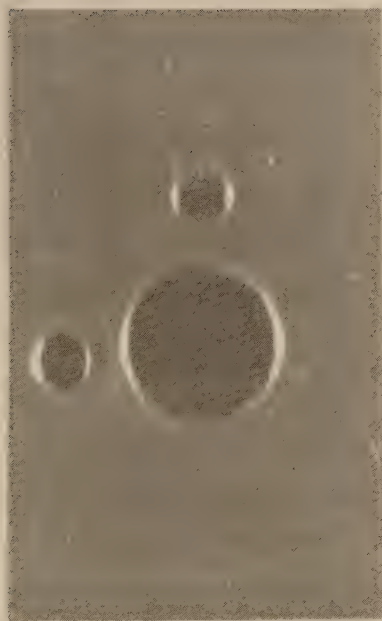


Abb. V
 Radialimmundiffusion der durch die Ultrazentrifuge isolierten HDL des Fruchtwassers (F.W. = Fruchtwasser, 1 = Anti-₁ - Lipoproteinantiserum, 4 = Anti-Albuminantiserum).

Abbildungen Va und V zeigen, daß die mit Hilfe der Ultrazentrifuge isolierten HDL rein sind. Es findet sich nur noch eine Präcipitationslinie gegen Anti α_1 - Lipoproteinserum, nicht jedoch gegen Antialbuminserum.

Von den isolierten HDL wurden Elektrophoresen nach Seidel und Greten (Lipoproteinelektrophoresen) und eine Proteinelektrophorese angefertigt (Abbildung VI).

Fruchtwasser HDL Elektrophorese

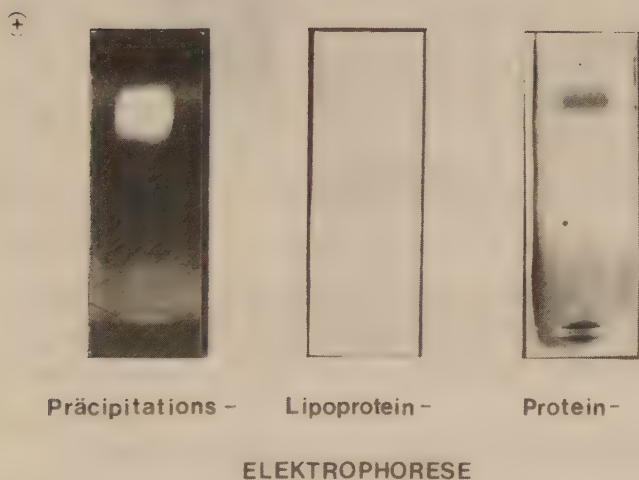


Abb. VI
Elektrophoresen der aus dem Fruchtwasser isolierten HDL

Es fanden sich Banden im α_1 - Bereich in der Lipoproteinelektrophorese nach Seidel (Präcipitationselektrophorese) und in der Proteinelektrophorese, jedoch keine in der herkömmlichen Lipoproteinelektrophorese nach Greten.

IMMUNELEKTROPHORESE

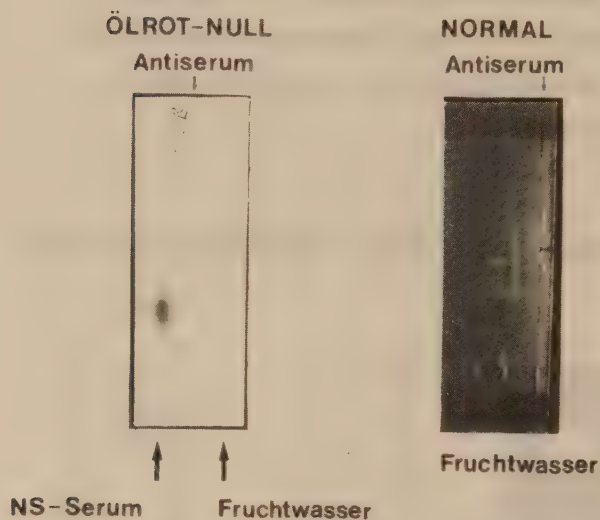


Abb.VII

Immunoelektrophorese von Nabelschnurserum (NS) und Fruchtwasser gegen Anti Apo A und Anti Apo B. Färbung Ölrot O (links). Normale Immunoelektrophorese der Fruchtwasser HDL gegen Anti Apo A und Anti Apo B (rechts).

Abbildung VII zeigt eine Immunoelektrophorese von Nabelschnurserum (NS) einerseits und Fruchtwasser HDL andererseits gegen Anti Apo A und Anti Apo B. Die Immunoelektrophorese wurde anschließend mit Ölrot O angefärbt.

Mit Lipidfarbstoff wurden nur die Präcipitationslinien der Nabelschnurserumlipoproteine, nicht jedoch die des Fruchtwassers angefärbt. Daneben findet sich die Immunelektrophorese der Fruchtwasserlipoproteine in üblicher Art. Man sieht die typische Präcipitationslinie der HDL.

Die Proteinkonzentration der aus dem Fruchtwasser isolierten HDL betrug 2,8 mg/100 ml.

Die Gesamtmengen an Phospholipiden und Cholesterin in der isolierten Fraktion waren so gering, daß sie mit unseren Methoden quantitativ nicht bestimmt werden konnten.

Die Gesamtmenge der aus dem Fruchtwasser isolierten HDL war so gering, daß nur mehr der L/S Quotient bestimmt werden konnte. Der L/S Quotient für das gepoolte Fruchtwasser, welches zur Isolation herangezogen wurde, betrug 3,6. Der L/S Quotient der isolierten HDL betrug 0,82.

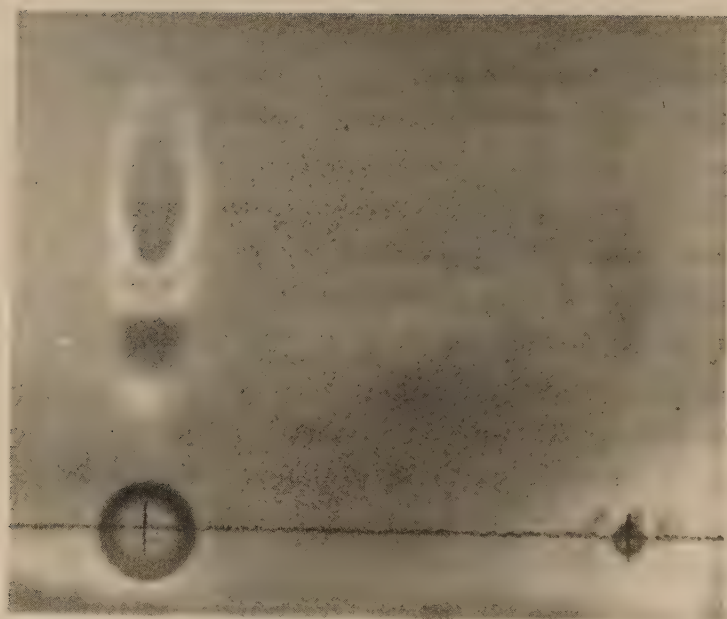


Abb. VIII
Dünnschichtchromatographieplatte angefärbt mit Bromthymol-
blau: Links Gesamfruchtwasser, rechts HDL des Fruchtwas-
sers.

In Abbildung VIII ist die Dünnschichtchromato-
graphieplatte, mit deren Hilfe der L/S Quotient
bestimmt wurde, dargestellt.

Bei einer Patientin in der rechnerisch 17. Schwangerschaftswoche (Nr. 16) wurde das Fruchtwasser nach den oben beschriebenen Kriterien untersucht. Es fanden sich in der Radialimmundiffusion eine Präcipitationslinie gegen Anti Apo A und eine gegen Anti Apo B, nicht jedoch gegen Anti Apo C.

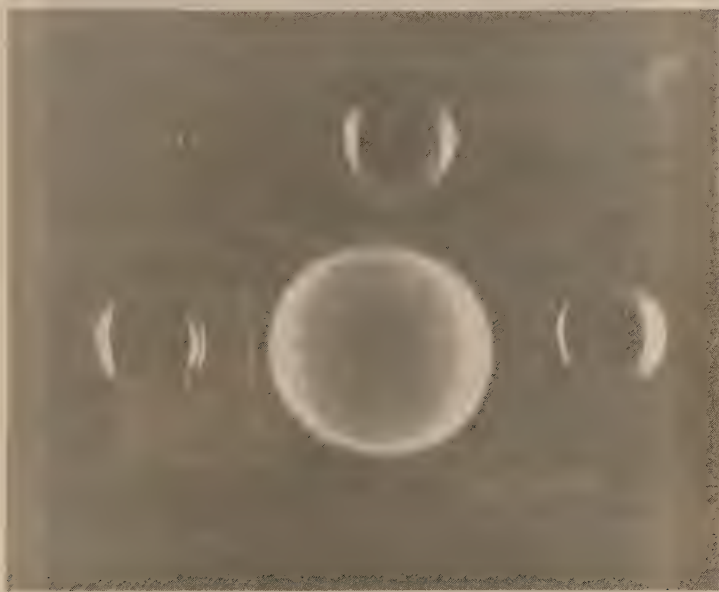


Abb. IX
Radialimmundiffusion Fruchtwasser (F.W.) gegen Anti-¹ - Lipo-
Proteinserum (Apo A) (1), Anti-² - Lipoproteinserum (Apo B)
(2) und Anti Apo C Serum (3).

Die Präzipitationselektrophorese (Abbildung X) zeigt deutlich α_1 - Lipoproteine und in geringer Konzentration β - Lipoproteine im Fruchtwasser.



Abb. X
Präzipitationselektrophorese: Links Fruchtwasser
Rechts Nabelschnurserum

Weitere Bestimmungen, speziell die Auftrennung in der Ultrazentrifuge, konnten auf Grund der geringen Fruchtwassermenge nicht durchgeführt werden.

DISKUSSION

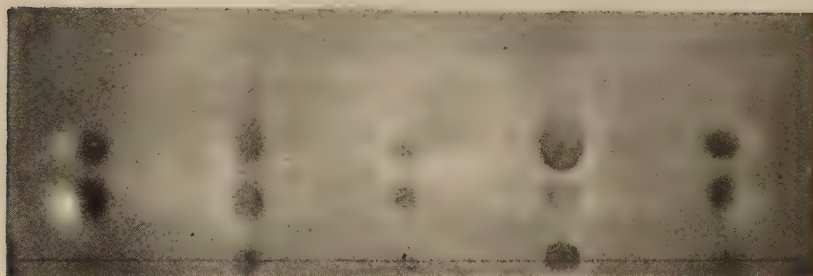
Lezithin - Sphingomyelin Quotient

Zur Bestimmung der foetalen Lungenreife werden verschiedene Untersuchungen des Fruchtwassers angegeben. Alle Methoden basieren auf dem Nachweis von oberflächenaktiven Phospholipiden, speziell dem Lezithin. Nelson (2) und Bhagwanani (6) bestimmen quantitativ das Lezithin, während Clements (5) die Gesamtmenge an pulmonalaktiven Phospholipiden bestimmt (Shake-Test). Gluck (11) mißt das Verhältnis von Lezithin zu Sphingomyelin im Fruchtwasser (L/S ratio). Diese Untersuchung basiert auf der Tatsache, daß im Fruchtwasser die Konzentration von Lezithin und Sphingomyelin bis zur 35. Schwangerschaftswoche praktisch gleich ist; anschließend, entsprechend der Zunahme der foetalen Lungenreife, die Lezithinkonzentration um das vierfache gegenüber der Sphingomyelinmenge ansteigt.

Bei einer L/S ratio über 2 ist nach Gluck eine reife Lunge zu erwarten. Im Gestationsalter entspricht das Auftreten der Lungenreife in etwa der 35. - 36. Schwangerschaftswoche, wobei schon vor der 35. Schwangerschaftswoche eine Lungenreife, oder auch nach der 36. Schwangerschaftswoche, keine vorhanden sein kann. Die von Gluck angegebene Methode hat den großen Vorteil, daß sie 1. genau ist und 2. nur einmal Fruchtwasser zur Feststellung der Lungenreife punktiert werden muß. Aus diesem Grund wird in der I. Universitäts-Frauenklinik München die Methode nach Gluck in der Modifikation von Borer angewandt. Die Darstellung einer üblichen Dünnschichtchromatographieplatte zur Bestimmung der L/S ratio findet sich in Abbildung XI.

LEZITHIN / SPHINGOMYELIN - QUOTIENT

L / S



L/S	Probe 1	L/S	Probe 2	L/S
1:2	24.SSW	1:1	40.SSW	2:1

Abb. XI

Wie aus Tabelle I und II ersichtlich, bewegen sich unsere Werte für die L/S ratio in den zu erwartenden Größenordnungen.

Da die obengenannten Autoren einerseits keine Aussage über eventuelle Trägersubstanzen der Phospholipide machen, andererseits aber aus dem Plasma bekannt ist, daß dort die Phospholipide wie auch die anderen Lipide von Lipoproteinen transportiert werden, war es interessant, nach Lipoproteinen im Fruchtwasser zu suchen.

Lipoproteine

Die Plasmalipoproteine sind durch eine Reihe von Untersuchungen recht genau charakterisiert. Die Lipoproteine bestehen immer aus einem Proteinanteil, genannt Apo - Protein, und aus dem dazugehörigen Lipidanteil, bestehend immer aus Phospholipiden, Triglyceriden und Cholesterin. Die Zusammensetzung der Lipoproteinfamilie ist verschieden. Ihre Charakteristika finden sich in der Tabelle III und die Verteilung der Apo - Lipoproteine sind in Abbildung XII dargestellt (Tabelle III und Abbildung XII nach Seidel (32)).

Charakteristik der Plasmalipoproteine

Dichte- klasse	0,9 g/ml	VLDL 1,006 g/ml	LDL 1,063 g/ml	HDL 1,21 g/ml
Elektro- phoretische Mobilität	Chylo- mikronen	Prä- β - Lipo- proteine	β -Lipo- proteine	α -Lipo- proteine
Größe und Form	1000-10000 A 	300-700 A 	150-700 A 	75-100 A 
Protein- Lipid- Zusammen- setzung	Prot. 1% PL 4% C 6% TG 85-90%	Prot. 8-10% PL 18% C 19% TG 50%	Prot. 20% PL 23% C 45% TG 10%	Prot. 50% PL 30% C 18% TG 2-5%

Tab. III

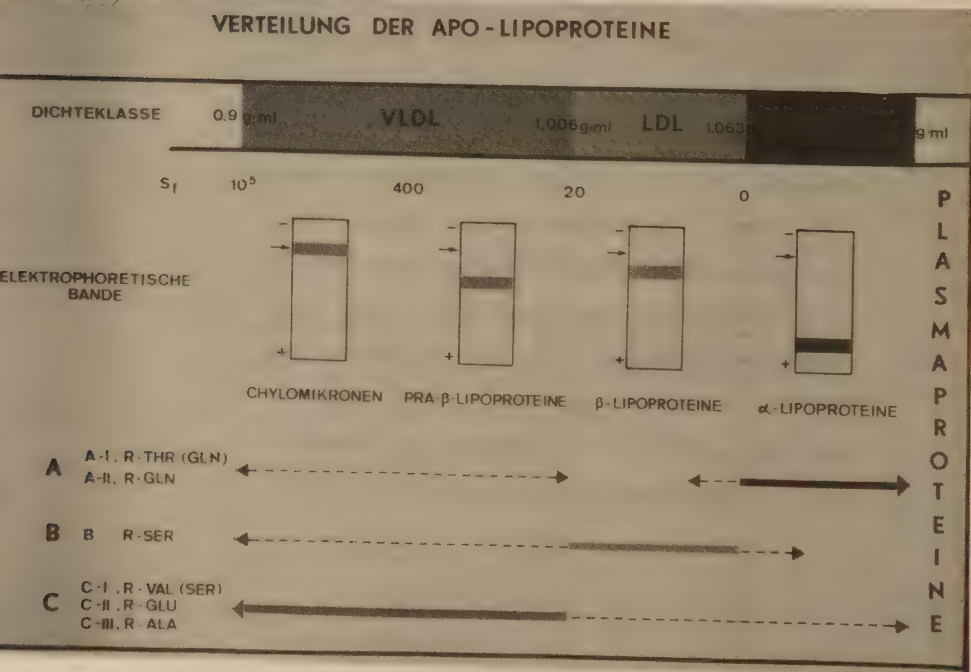


Abb. XII

Die Lipoproteine unterscheiden sich durch die Dichteklassen und durch die elektrophoretische Mobilität. Diese beiden Unterteilungen ergeben sich auf Grund der verschiedenen Apo-Proteinanteile. Die Apo-Proteine einzeln sind verantwortlich für die elektrophoretische Mobilität, während ihre Kombination wahrscheinlich für die Proteinlipidzusammensetzung verantwortlich ist.

Lipoproteine im Fruchtwasser sind bisher gar nicht oder nur gelegentlich nachgewiesen worden (13 - 20). Sutcliffe (16) wies in gepooltem Fruchtwasser d_1 - Lipoproteine immunologisch nach. Er injizierte das Fruchtwasser Kaninchen und identifizierte anschließend die von ihnen gebildeten Antikörper. Die Fruchtwasserentnahme geschah jedoch nicht streng transabdominell, ebensowenig wie die Kontamination mit Blut ausgeschlossen war. Die anderen Autoren konnten Lipoproteine nicht sicher nachweisen. Insbesondere gelang es bisher niemals, Lipoproteinelektrophoresen von Lipoproteinen im Fruchtwasser anzufertigen. Demgegenüber konnten wir bei sämtlichen Schwangerschaften über der 20. Schwangerschaftswoche Lipoproteine und zwar nur d_1 - Lipoproteine nachweisen (vergleiche Tabelle I und II).

Sie wurden immunologisch getestet (Abbildung IV). Ferner wurde mit Hilfe einer neuen Lipoproteinelektrophoresetechnik ihre elektrophoretische Mobilität nachgewiesen (Abbildung II und III). Zur Frage der Nichtanfärbbarkeit mit Lipidfarbstoff wurden die HDL des Fruchtwassers mit Hilfe der Ultrazentrifuge isoliert. Ihre Reinheit wurde in der Doppelimmundiffusion nachgewiesen (Abbildung V). Anschließend wurden die isolierten HDL drei verschiedenen Elektrophoresemethoden unterworfen (Abbildung VI). Auch hier konnten die Lipoproteine nicht mit Hilfe der üblichen Lipidfärbemittel sichtbar gemacht werden, sie stellten sich jedoch in der Lipoproteinelektrophorese nach Seidel (Präcipitationselektrophorese) und der Proteinelektrophorese dar. Auch in der Immunelektrophorese, die anschließend mit Lipidfarbstoff (Ölrot O) angefärbt wurde, konnten die Fruchtwasserlipoproteine nicht dargestellt, die Serumlipoproteine jedoch angefärbt werden (Abbildung VII). In der normalen Immunelektrophorese war die Präcipitationslinie der HDL sichtbar (Abbildung VII). Die Ursache könnte in der zu

geringen Lipidaufladungen der d_1 - Lipoproteine des Fruchtwassers liegen. Während in der Elektrophorese nach Seidel der Lipoproteinkomplex ausgefällt und damit sichtbar wird, lagert sich demgegenüber der Lipidfarbstoff an die Triglyceride an. In den d_1 - Lipoproteinen des Fruchtwassers sind somit scheinbar nur sehr wenig oder keine Triglyceride vorhanden. Die Ursache hierfür kann in dem Fehlen von Apo B und Apo C im Fruchtwasser liegen. Somit wäre es erklärlich, warum bisher im Fruchtwasser nie mit Sicherheit Lipoproteine nachgewiesen wurden.

HDL und L/S ratio

Zur Frage, ob der Lezithin - Sphingomyelin Quotient in einem direkten Zusammenhang mit den Lipoproteinen zu bringen ist, wurde der L/S Quotient im Gesamtfruchtwasser und in den isolierten HDL bestimmt. Während er im Gesamtfruchtwasser 3,6 betrug, war er in den isolierten HDL nur 0,82. Dies ist erstaunlich, da im Plasma die Phospholipide, und

hier besonders das Lezithin, durch die d_1 - Lipoproteine transportiert werden (Tabelle III, Abbildung XII). Aus diesen, allerdings nur einzelnen Werten, scheint in der Beziehung zwischen den Lipoproteinen und dem L/S Quotienten im Fruchtwasser kein Zusammenhang zu bestehen.

Zur Frage des Verhaltens der Lipoproteine im Fruchtwasser vor der 20. Schwangerschaftswoche konnte in dieser Arbeit keine genaue Aussage gemacht werden. Es stand leider nur das Fruchtwasser einer Patientin zur Verfügung.

Interessanterweise fanden sich neben den d_1 - Lipoproteinen auch geringe Mengen an β - Lipoproteinen; jedoch kein Apo C (Abbildung IX und X). Die Ursache und eine Deutung dieser Befunde bleibt weiteren Arbeiten überlassen.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Fruchtwasser von 24 Patientinnen in der rechnerisch 18. - 40 Schwangerschaftswoche wurde untersucht. Es wurden mit Hilfe immuno-logischer und elektrophoretischer Verfahren Lipoproteine im Fruchtwasser erstmals sicher nachgewiesen. Hierbei fiel auf, daß im Fruchtwasser der 20. - 40. Schwangerschafts-woche nur α_1 - Lipoproteine (HDL) nachweisbar waren. Im Gegensatz zu anderen Autoren konnte mit Hilfe einer neuartigen Lipoprotein-elektrophorese die normale elektrophoretische Mobilität nachgewiesen werden. Die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen den Lipoproteinen im Fruchtwasser einerseits und dem Lezithin - Sphingomyelin Quotienten andererseits besteht, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Diese Frage, sowie das quantitative Verhalten der Lipoproteine im Fruchtwasser im Verlauf der Gestation, bleibt weiteren Forschungsarbeiten überlassen.

LITERATUR - VERZEICHNIS

- 1 Nelson, G.H.: Amer. J. Obstet. Gynec. 105, 1072 (1969)
- 2 Nelson, G.H.: Amer. J. Obstet. Gynec. 112, 827 (1972)
- 3 Nelson, G.H., Lawson, S.W.: Amer. J. Obstet. Gynec. 115, 933 (1973)
- 4 Clements, J.A.: The alveolar lining layer. In: Development of the lung. Ciba Found. Symp. Boston: Little Brown and Comp. 1967
- 5 Clements, J.A., Platzker, A.C.G., Tierney, D.F., Hobel, C.J., Creasy, R.K., Margolis, A.J., Thibeault, D.W., Tooley, W.H., Oh, W.: New Engl. J. Med. 286, 1077 (1972)
- 6 Bhagwanani, S.G., Fahmy, D., Turnbull, A.C.: Lancet 1972 I, 159
- 7 Bhagwanani, S.G., Fahmy, D., Turnbull, A.C.: Lancet 1972 II, 66
- 8 Bhagwanani, S.G., Fahmy, D., Turnbull, A.C.: Brit. med. J. 697 (1973)
- 9 Gluck, L., Motoyama, E.K., Smits, H.J., Kulovich, M.V.: Pediat. Res. 1, 237 (1967)
- 10 Gluck, L., Kulovich, M.V., Borer, R.C., Jr., Brenner, P.H., Anderson, G.G., Spellacy, W.N.: Amer. J. Obstet. Gynec. 109, 440 (1971)
- 11 Gluck, L.: Procedure for The Intrauterine Assessment of Pulmonary Maturity by the Phospholipids in Amniotic Fluid ("cocoobook"). University of California: 1971
- 12 Gluck, L., Kulovich, M.V.: Amer. J. Obstet. Gynec. 115, 539 (1973)

- 13 Gitlin,D.;Biasucci:J.Clin.Invest.
48,1433 (1969)
- 14 Usategui-Gomez,M.;D.F.Morgan;H.W.
Toolan:Proc.Soc.Exp.Biol.Med.123,
547 (1966)
- 15 Usategui-Gomez,M.;M.S.Hopkins;BA,
A.F.De Castro:Obst.Gyn.36,865
(1970)
- 16 Sutcliffe R.G.;D.D.H.Brock:J.Obst.
Gynaec.Brit.Cwlth.
- 17 Fischbacher,P.H.;W.L.G.Quinlivan:
Am.J.Obst.Gyn. 108,1051 (1970)
- 18 Queenan,J.T.;E.C.Gadow;P.Bachner
S.F.Kubarych:Am.J.Obst.Gyn.108,
406 (1970)
- 19 Heron,H.J.:J.Obst.Gynaec.Brit.
Cwlth. 73,91 (1966)
- 20 Derrington,M.M.;J.F.Soothill:
J.Obst.Gynaec.Brit.Cwlth.755 (1961)
- 21 Seidel D.;H.Wieland;C.Ruppert:Clin.
Chem. 19,737 (1973)
- 22 Noble,R.P.:J.Lipid Res.9,693-700
(1968)
- 23 Greten,H.,Seidel,D.,Walter,Bl.,
Kolbe,J.:Germ.med.Mth.15,29-33
(1971)
- 24 Boehringer Testfibel
- 25 Heil,A.;W.Zillig:Febs Letters II,
165 (1970)
- 26 Ewing,A.M.;N.K.Freeman;F.T.Lindgren:
Advanc.Lipid.Res. 3,25 (1965)
- 27 Grabar,P.;Williams,C.A.,Jr.:Biochim.
biophys.Acta (Amst) 17,67-74 (1955)
- 28 Ouchterlony,O.:Acta path.microbiol.
Scand.32, 231-240 (1953)

- 29 Seidel,D.,Alaupovic,P.,Furman,R.H.:
J.clin.Invest.48, 1211-1223 (1969).
- 30 Seidel,D.,Alaupovic,P.,Furman,R.H.,
McConathy,W.J.:J.Clin.Invest. 49,
2396-2407 (1970)
- 31 Liley, A.W.:Am.J.Obst.Gyn. 82, 1359
(1961)
- 32 Seidel,D.:in Schettler:Fettstoff
wechselstörungen,ihre Erkennung und
Behandlung (Thieme,Stuttgart 1971)

LEBENS LAUF

Am 30. August 1944 wurde ich als 2. Sohn des Arztes Dr. med. Waldemar Kufner und seiner Ehefrau Annemarie, geb. Wagner, in Bad Reichenhall geboren.

1946 zogen wir nach Maria Gern bei Berchtesgaden, wo ich die Volksschule 4 Jahre lang besuchte. 1954 im Herbst wechselte ich auf das Realgymnasium Berchtesgaden und legte dort im Juli 1964 meine Reifeprüfung ab.

Nach 12 Monaten Bundeswehr begann ich im Wintersemester 1965/66 das Medizinstudium an der Universität München. Dort bestand ich im Frühjahr 1970 das Physikum und im Juni 1973 das Medizinische Staatsexamen.

Herrn Prof. Dr. J. Zander, Direktor der I. Frauenklinik der Universität München danke ich für die guten Arbeitsbedingungen, die mir in seiner Klinik geboten wurden.

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Lochmüller, Oberarzt der I. Universitäts-Frauenklinik München danke ich für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Wengeler, wissenschaftlicher Assistent in der I. Universitäts-Frauenklinik München. Er führte mich in die wissenschaftliche Arbeit ein und stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Für weitere labortechnische Anleitung danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. E. Kuss, Leiter der wissenschaftlichen Laboratorien der I. Universitäts-Frauenklinik München, Herrn Oberarzt Priv. Doz. Dr. H. Graeff und Herrn Prof. Dr. D. Seidel, Leiter des klinischen Laboratoriums der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg.

Mein besonderer Dank gilt der Universität München, die mir durch ein Graduiertenstipendium diese Arbeit ermöglichte.

